

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2004年1月15日 (15.01.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/005935 A1

(51)国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/68, 33/50, 30/88

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/008525

(22)国際出願日: 2003年7月4日 (04.07.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2002-195315 2002年7月4日 (04.07.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 三菱  
ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市  
中央区平野町二丁目6番9号 Osaka (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 橋本謙二  
(HASHIMOTO,Kenji) [JP/JP]; 〒202-0013 東京都 西  
東京市 中町5丁目17番2号 Tokyo (JP). 伊豫雅臣  
(IYO,Masaomi) [JP/JP]; 〒262-0033 千葉県 千葉市 花  
見川区幕張本郷7丁目21番15号 Chiba (JP). 福島  
健 (FUKUSHIMA,Takeshi) [JP/JP]; 〒420-0816 静岡  
県 静岡市 菅谷6-25-7 セジュール菅谷A201  
Shizuoka (JP). 今井一洋 (IMAI,Kazuhiro) [JP/JP]; 〒

(74)代理人: 高島一 (TAKASHIMA,Hajime); 〒541-0044  
大阪府 大阪市 中央区伏見町四丁目2番14号 藤村  
大和生命ビル Osaka (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/005935 A1

(54)Title: METHOD OF EXAMINING AND DIAGNOSING INTEGRATION DYSFUNCTION SYNDROME

(54)発明の名称: 統合失調症の検査、診断方法

(57)Abstract: A method of examining and diagnosing integration dysfunction syndrome characterized by comprising measuring the concentrations of D-serine and L-serine in a biological sample. According to this method, integration dysfunction syndrome can be examined and diagnosed by measuring the concentrations of D-serine and L-serine in a biological sample by using an analytical technique such as high-performance liquid chromatography.

(57)要約: 本発明は、D型セリン及びL型セリンの生体試料中の濃度を測定することを特徴とする統合失調症の検査、診断方法に関する。本発明の方法によれば、高速液体クロマトグラフィーなどの分析技術を用いて生体試料中のD型セリン及びL型セリンの濃度を測定することによって、統合失調症の検査、診断ができる。

明細書  
統合失調症の検査、診断方法  
技術分野

本発明は、統合失調症の検査、診断方法に関する。さらに詳しくは生体試料中のD  
5 型セリン、L型セリン又はD型セリン及びL型セリンの濃度を測定することを特徴と  
する統合失調症の検査、診断方法に関する。

背景技術

統合失調症 (Schizophrenia) は、人口の約 1 % の割合で起こり、思春期から 20 代  
の若い時期に発症する。症状としては、幻覚、妄想などの陽性症状、感情鈍麻、意欲  
10 減退、社会的引きこもりなどの陰性症状、及び認知機能障害などがある。病態の特殊  
性から早期診断、治療、社会復帰活動、再発予防といった包括的な治療体系の確立が  
望まれている。統合失調症の治療には、薬物治療が不可欠であり、フェノチアジン系  
化合物、ブチロフェノン系化合物、ベンズアミド系化合物、イミノジベンジル系化合物、  
15 チエピン系化合物、インドール系化合物及びセロトニン・ドーパミン受容体遮断  
薬などが投与されている。

統合失調症の病態には、遺伝的要因及び環境要因が関与していることが知られている。  
フェンサイクリジン、ケタミンなどのNMDA受容体遮断薬によって統合失調症  
と酷似した症状が引き起こされることが知られており、いわゆる「統合失調症のグル  
タミン酸機能低下仮説」が提唱されている。現在のところ、統合失調症を検査、診断  
20 する生物学的マーカーが無い。血液や尿などの患者のサンプルを用いた研究が数多く  
行なわれてきたが、未だに確立されたものは無い。

ところで、D型アミノ酸は、哺乳類には存在しないと思われていたが、近年、D型  
セリンを含むD型アミノ酸がヒトを含む哺乳類にも低濃度で存在することが明らかに  
なってきた。一方、D型セリンは、興奮性の神経伝達を司るグルタミン酸受容体のサ  
25 プタイプNMDA受容体のグリシン部位のアゴニストとして作用することが知られて  
いる。統合失調症のグルタミン酸機能低下仮説に基づくと、D型セリンが統合失調症  
の病態に関与している可能性がある。

したがって、統合失調症患者の治療のためにD型セリンを投与する方法 (米国特許

第6162827号明細書) や、統合失調症、アルツハイマー病、自閉症、鬱病などの神経精神疾患の治療に、NMDA受容体のグリシン部位のアゴニストであるD型セリン、D型アラニン等を投与する方法が知られている (国際公開WO 99/52519号パンフレット)。

5 統合失調症による入院患者は日本における病院の総ベッド数の約15%を占め、医療経済という点からも問題は大きい。医療の現場から統合失調症を早期に検査、診断するような検査、診断薬及び検査、診断方法の開発が望まれている。

尚、統合失調症は従来「精神分裂病」と呼ばれていたが、2002年8月に開催された日本精神神経学会総会で「統合失調症」と病名が変更になった。「精神分裂病」、

10 「統合失調症」はともに「Schizophrenia」を意味する。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行なった結果、統合失調症患者の生体試料 (例えば血清等) 中のD型セリン及びL型セリンのレベルが、健常者とのれと比較して有意に変化していることを見出した。

15 特に、本発明者らは、NMDA受容体アゴニスト活性を有するD型セリンが統合失調症患者末梢血で有意に減少していることを初めて発見した。これまでセリン (トータルセリン: D型セリンとL型セリンの総和、約99%がL型セリン) が統合失調症患者末梢血中で増加しているという報告はあったが、今回トータルセリン、L型セリ

ン、D型セリンそれぞれを測定したところ、トータルセリンはやはり統合失調症患者

20 で増加 ( $P=0.017$ )、L型セリンも同様に増加 ( $P=0.012$ ) していたのに対し、D型セリンは統合失調症患者で減少 ( $P=0.001$ ) しており、D型セリン/トータルセリンの比も患者で明らかに減少 ( $P=0.0001$ ) していることが判明した。D型セリンの減少と、患者の

病態 (陰性、陽性など)、薬物治療の有無、薬剤投与背景などとの明確な相関は見られ

なかつたが、ただ薬物治療群でのみ解析した際に、D型セリンとBPRSスコア (Brief

25 Psychiatric Rating Scale、このスコアが低いほど改善度が高い) に関してむしろ正の相関がみられた。D型セリンの減少に関してはD型セリンの合成酵素セリンラセマーゼ、分解酵素D型アミノ酸酸化酵素、D型セリントランスポーター等の関与が考え

られる。

本発明は、上記の知見等に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は以下の（1）から（28）に関する。

（1） 生体試料中の（a）D型セリン、（b）L型セリン又は（c）D型セリン及びL型セリンの濃度を測定することを特徴とする統合失調症の検査方法。

5 （2） 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より低いことを指標とする前記（1）記載の統合失調症の検査方法。

（3） 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値一標準偏差より低いことを指標とする前記（1）記載の統合失調症の検査方法。

10 （4） 生体試料中のD型セリン濃度が統合失調症個体又は個体群における該濃度の平均値十標準偏差より低いことを指標とする前記（1）記載の統合失調症の検査方法。

（5） 生体試料中のL型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より高いことを指標とする前記（1）記載の統合失調症の検査方法。

（6） 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合を指標とする前記（1）記載の統合失調症の検査方法。

15 （7） 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値より低いことを指標とする前記（6）記載の統合失調症の検査方法。

（8） 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値一標準偏差より低いことを指標とする前記（6）記載の統合失調症の検査方法。

20 （9） 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が統合失調症個体又は個体群における該割合の平均値十標準偏差より低いことを指標とする前記（6）記載の統合失調症の検査方法。

（10） D型セリン療法が有効な統合失調症患者を選別する前記（1）乃至（9）のいずれかに記載の統合失調症の検査方法。

25 （11） アミノ酸標識試薬を用いる前記（1）乃至（10）のいずれかに記載の統合失調症の検査方法。

（12） 生体試料にアミノ酸標識試薬を接触させ、セリンを標識する工程及び標識

D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程を含む前記（11）記載の統合失調症の検査方法。

（13） 標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程の前に標識セリンを分離・定量する工程を更に含む前記（12）記載の統合失調症の検査方法。

5 （14） 標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程にカラム又はキャピラリーを用いる前記（12）記載の統合失調症の検査方法。

（15） 標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程にカラム又はキャピラリーを用いる前記（13）記載の統合失調症の検査方法。

（16） 標識セリンを分離・定量する工程にクロマトグラフィーを用いる前記（110 3）記載の統合失調症の検査方法。

（17） 標識セリンを分離・定量する工程にクロマトグラフィーを用いる前記（15）記載の統合失調症の検査方法。

（18） カラム又はキャピラリーが光学分割用カラム又はキャピラリーである前記（14）、（15）又は（17）記載の統合失調症の検査方法。

15 （19） クロマトグラフィーが高速液体クロマトグラフィーである前記（16）又は（17）記載の統合失調症の検査方法。

（20） クロマトグラフィーが高速液体クロマトグラフィーであり、カラム又はキャピラリーが光学分割用カラム又はキャピラリーである前記（17）記載の統合失調症の検査方法。

20 （21） アミノ酸標識試薬がアミノ酸蛍光標識試薬である前記（11）乃至（20）のいずれかに記載の統合失調症の検査方法。

（22） アミノ酸蛍光標識試薬が4-フルオロー-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾールである前記（21）記載の統合失調症の検査方法。

（23） アミノ酸標識試薬を含有する統合失調症の検査用試薬。

25 （24） アミノ酸標識試薬がアミノ酸蛍光標識試薬である前記（23）記載の統合失調症の検査用試薬。

（25） アミノ酸蛍光標識試薬が4-フルオロー-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾールである前記（24）記載の統合失調症の検査用試薬。

(26) 血清中のD型セリン及びL型セリンの濃度を測定し、濃度の増減を指標とすることを特徴とする統合失調症の検査、診断方法。

(27) 血清中のD型セリン濃度を測定し、濃度の減少を指標とすることを特徴とする統合失調症の検査、診断方法。

5 (28) 血清中のL型セリン濃度を測定し、濃度の増加を指標とすることを特徴とする統合失調症の検査、診断方法。

#### 発明の実施の形態

本発明による統合失調症の検査、診断は、例えば次のようにして行なうことができる。生体試料（例えばヒトの血清）を調製し、生体試料中のトータルセリン、D型セリン及び／又はL型セリンの濃度を種々の方法により定量する。統合失調症患者の生体試料（例えば血清）中のD型セリン濃度及び／又はトータルセリンに対するD型セリンの濃度比が、健常者の値より有意に低いこと等を利用し、統合失調症を検査、診断する。

即ち、統合失調症の指標としては、例えば、

15 i) 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より低いこと。

ii) 生体試料中のL型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より高いこと。

iii) 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は

20 個体群における該割合の平均値より低いこと。

等の指標が挙げられる。

さらに、統合失調症の好ましい指標としては、例えば、

iv) 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値－標準偏差より低いこと。

25 v) 生体試料中のD型セリン濃度が統合失調症個体又は個体群における該濃度の平均値＋標準偏差より低いこと。

vi) 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値－標準偏差より低いこと。

vii) 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が統合失調症個体又は個体群における該割合の平均値+標準偏差より低いこと。  
等が挙げられる。

ここで、「D型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値(一標準偏差)より低い」とは、「一個体のD型セリン濃度が、その個体が健常であるときの該濃度を複数回測定した値の平均値(一標準偏差)より低い」こと、又は「一個体のD型セリン濃度が、健常個体の集団の該濃度の平均値(一標準偏差)より低い」ことを意味する。また、「D型セリン濃度が統合失調症個体又は個体群における該濃度の平均値+標準偏差より低い」とは、「一個体のD型セリン濃度が、その個体が統合失調症であるときの該濃度を複数回測定した値の平均値+標準偏差より低い」こと、又は「一個体のD型セリン濃度が、統合失調症個体の集団の該濃度の平均値+標準偏差より低い」ことを意味する。本明細書中、「健常個体または個体群における該割合の平均値(一標準偏差)」、「統合失調症個体又は個体群における該割合の平均値+標準偏差」等の意味も、同様に解することとする。

15 本発明において、生体試料中のD型セリン濃度のみを測定し、D型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度より低いことを指標として統合失調症の検査、診断をすることもできる。このとき、好ましい指標としては、例えば生体試料が血清である場合、D型セリン濃度が $2.00 \mu\text{mol/L}$ 以下であることである。

また、本発明において、生体試料中のL型セリン濃度のみを測定し、L型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度より高いことを指標として統合失調症の検査、診断をすることもできる。このとき、好ましい指標としては、例えば生体試料が血清である場合、L型セリン濃度が $190 \mu\text{mol/L}$ であることである。

さらに、本発明において、生体試料中のトータルセリン濃度を測定し、トータルセリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度より高いことを指標として統合失調症の検査、診断をすることもできる。このとき、好ましい指標としては、例えば生体試料が血清である場合、トータルセリン濃度が $190 \mu\text{mol/L}$ 以上であることである。

本発明の検査、診断に供することのできる生体試料としては、例えば血清、血漿、

血液、尿、髄液、唾液、涙液、汗等の生体由来の液体成分、毛髪、血球、バイオプシー等で切除された組織の一部等の生体由来の固形成分等が挙げられ、生体由来の全ての成分が含まれる。好ましい生体試料としては血清が挙げられる。また、生体から直接採取された試料に、種々の処理を加えて得られた産物も本発明における生体試料である。この場合、処理の種類、回数は限定されず、複数種類の処理を組み合わせたものであってもよい。処理の種類としては、例えば除蛋白、脱塩、透析、酸／塩基／緩衝液等の添加、加熱、カラムによるアミノ酸含有画分の分離・精製等が挙げられるが、これらのものに限定されない。

本発明の検査、診断に供せられる試料の由来する生体としては、ヒトを含む哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、モルモット等）が挙げられる。

本発明の統合失調症の検査、診断方法において、生体試料中のD型及びL型セリンの濃度を測定する方法は自体公知の全ての方法を用いることができる。また、今後新たに開発されるであろう、生体試料中のD型及びL型セリンの濃度を測定する方法も用いることが可能である。好ましくはアミノ酸標識試薬により生体試料中のセリンを含むアミノ酸を標識して、検出感度を上昇させる。ここで、アミノ酸標識試薬とは、アミノ酸の分離・定量等に際して、その検出感度を上昇させる目的で、アミノ酸を標識する試薬であり、アミノ酸標識試薬とアミノ酸／セリンとを反応させることにより、それぞれ標識アミノ酸／セリンを得る。アミノ酸標識試薬としてはアミノ酸吸光標識試薬、アミノ酸蛍光標識試薬及びアミノ酸発光標識試薬とがあり、アミノ酸／セリンと反応することにより各々吸光標識アミノ酸／セリン、蛍光標識アミノ酸／セリン又は発光標識アミノ酸／セリンを得る。これらの吸光度、蛍光強度又は発光強度を指標に生体試料中のアミノ酸、セリンを分離・定量する。好ましくはアミノ酸蛍光標識試薬を用いる。アミノ酸吸光標識試薬としては例えばニンヒドリン等が挙げられる。アミノ酸蛍光標識試薬としては例えば、オルトフタルアルデヒド（O P A）、フルオレッサミン（F L A）、ナフタレン-2, 3-ジカルボキシアルデヒド（N D A）、ダンシルクロリド（D N S-C 1）、9-フルオレニルメチルクロロホルメート（F M O C-C 1）、3, 4-ジヒドロ-6, 7-ジメトキシ-4-メチル-3-オキソキノキサリシン-2-カルボニルクロリド（D M E Q-C O C 1）、7-メチルクマリン-3-カル

ボニルフルオリド、4-フルオロ-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾール (NBD-F)、4-クロロ-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾール (NBD-C1)、DBD試薬、蛍光性エドマン試薬、フルオレッセインイソチオシアネット、DBD-NCS、DBD-Pro-COC1、NBD-Pro-COC1、(+)-1-(1-イソシアネットエチル)ナフタレン、(+)-1-(9-フルオレニル)エチルクロロホルムート、N-アセチル-L-システイン等が挙げられ、いずれも本発明に用いることが出来るが、好ましくは4-フルオロ-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾール (NBD-F) を用い、これとアミノ酸/セリンを反応させてNBD標識アミノ酸/セリンを得る。

10 本発明の統合失調症の検査、診断方法における、生体試料中のセリンの測定方法としては、例えば、生体試料にアミノ酸標識試薬を接触させ、セリンを標識する工程及び標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程を含む測定方法が挙げられる。

ここで、標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程の前に、標識セリンを分離・定量する工程を更に含むことが好ましい。

即ち、本発明の統合失調症の検査、診断方法における、生体試料中のセリンの好ましい測定方法としては、例えば、以下の工程、

工程1：生体試料にアミノ酸標識試薬を接触させ、セリンを標識する工程；

工程2：標識セリンを分離・定量する工程；

20 工程3：標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程；  
を含む測定方法が挙げられる。

該測定方法は、通常工程1→工程2→工程3の順で行われる。ここで、工程1の前、工程1と工程2の間、工程2と工程3の間に他の工程を行うことを妨げるものではない。

25 上記工程2において、標識セリンを分離・定量する方法は、特に限定されないが、好ましくはクロマトグラフィーを用いる。標識セリンの分離・定量に使用することの出来るクロマトグラフィーとしては、例えば移動相が液体であるクロマトグラフィー(例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、中高圧液体クロマトグラフィー等)、

移動相が気体であるクロマトグラフィー（例えばガスクロマトグラフィー）、移動相が超臨界液体であるクロマトグラフィー（例えば超臨界液体クロマトグラフィー）が挙げられるが、好ましくは高速液体クロマトグラフィーを用いる。移動相又は試料の移動手段としては、ポンプ等による物理的手段の他、電気的手段（例えば電気泳動等）  
5 を用いることも出来る。

標識セリンは、上記のクロマトグラフィーの装置に設置された適当な分離媒体を介して分離される。好ましい分離媒体としては、カラム、キャピラリー、ゲル、薄層等が挙げられ、より好ましくはカラムが挙げられる。標識セリンの分離に用いることの出来るカラムとしては、例えば逆相カラム、順相カラム、イオン交換カラム、配位子  
10 交換カラム、イオン排除カラム、サイズ排除カラム（G P C 及びG F C）、光学分割用カラム、アフィニティカラム等が挙げられるが、好ましくは逆相カラム、イオン交換カラムを用いる。

分離された標識セリンは、適当な検出手段を用いて定量される。吸光標識セリンは吸光光度計によって、蛍光標識セリンは蛍光光度計によって定量することが望ましい。  
15 本工程により生体試料中のトータルセリン濃度を測定することができる。

なお、工程 2において、複数種のクロマトグラフィーを組み合わせて用いたり、複数種の分離媒体を組み合わせて用いたりしてもよい。

上記工程 3において、標識D型セリンと標識L型セリンとの分離・定量の方法は、特に限定されないが、好ましくはクロマトグラフィーを用いる。該クロマトグラフィーとしては、上記工程 2の標識セリンの分離・定量に使用することの出来るクロマトグラフィーと同様のクロマトグラフィーが例示され、好ましくは高速液体クロマトグラフィーを用いる。移動相又は試料の移動手段としては、ポンプ等による物理的手段の他、電気的手段（例えば電気泳動等）を用いることも出来る。

標識D型セリンと標識L型セリンとは、上記のクロマトグラフィーに設置された適  
25 当な分離媒体を介して分離される。該分離媒体の態様としては、本目的を達成できるものは全て用いることができるが、好ましくはカラム、キャピラリー、ゲル、薄層が挙げられ、より好ましくはカラム又はキャピラリーを用いる。標識D型セリンと標識L型セリンとの分離に用いることの出来るカラム又はキャピラリーとしては、例えば

逆相カラム又はキャピラリー、順相カラム又はキャピラリー、イオン交換カラム又はキャピラリー、配位子交換カラム又はキャピラリー、イオン排除カラム又はキャピラリー、サイズ排除カラム（G P C 及びG F C）又はキャピラリー、光学分割用カラム又はキャピラリー、アフィニティカラム又はキャピラリー等が挙げられるが、好み5 くは光学分割用カラム又はキャピラリーを用いる。

分離された標識D型セリン及び標識L型セリンは、上述の適当な検出手段を用いて定量される。本工程により生体試料中のD型セリン濃度及びL型セリン濃度を測定することができる。工程3においては、複数種のクロマトグラフィーを組み合わせて用いたり、複数種の分離媒体を組み合わせて用いたりしてもよい。

10 尚、前述の通り、工程2において標識セリンを分離し、これを工程3において更に標識D型セリンと標識L型セリンとに分離・定量するのが好ましい。この場合、工程2で分離された標識セリンを一度分取して、これを工程3に用いる。あるいは、一つのクロマトグラフィー装置に複数個のカラムをスイッチングバルブを介して連続して取り付ける等して、工程2と工程3とを連続的に行ってもよい。

15 生体試料中のD型セリン及びL型セリンを測定する更に具体的な方法としては、例えば、以下の工程、

工程（A）：生体試料に4-フルオロー7-ニトロー2, 1, 3-ベンズオキサジアゾール（NBD-F）を接触させ、セリンを標識する工程；

工程（B）：NBD標識セリンを高速液体クロマトグラフィーで分離・定量する工程；

20 工程（C）：NBD標識D型セリンとNBD標識L型セリンとを光学分割用カラムを用いて分離・定量する工程；

を含む方法や、以下の工程、

工程（I）： 生体試料に4-フルオロー7-ニトロー2, 1, 3-ベンズオキサジアゾールなどのアミノ酸蛍光標識試薬を接触させて、蛍光標識アミノ酸（例えばNBD

25 標識セリン等）を合成する工程；

工程（II）： NBD標識セリンを高速液体クロマトグラフィーで分離・定量する工程；

工程（III）： 分取したNBD標識セリンを光学分割用カラムを用いて分離・定量する工程；

からなる方法などが例示される。

本発明の統合失調症の検査、診断方法は、従来の主観的検査、診断方法（例えばD S M - I Vに従ったB P R S スコア判定等）や今後開発される全ての検査、診断方法と併用することもできる。また、何らかの方法によって、確定的に統合失調症である

5 ことが明らかな患者から、本発明の検査、診断方法において指標として使用し得るD型セリン、L型セリンの定量値についてのデータを収集することによって、本発明の検査、診断方法のみによって確定的な判定を下すことも可能となる。また、本発明の検査、診断方法は、法的責任能力の有無を調べる目的で、又はその他の目的で行われる精神鑑定に適用することも可能である。

10 本発明の検査、診断方法を用いることにより、患者の病態（陰性、陽性など）の判定、重症度の判定、病態の経過観察、治療効果の有無の判定、予後の予測、他の精神疾患との判別等が容易に出来る。特に、トータルセリンに対するD型セリンの濃度比が特に低い患者を選別できることから、D型セリン療法が有効な対照患者を、治療開始前に選別し、より効率的な治療を行うことが出来る。ここで、D型セリン療法とは、

15 例えば、D型セリン自体、セリンラセマーゼの発現を上昇させる化合物、セリンラセマーゼを活性化させる化合物、D型セリンのトランスポータ阻害剤又はD型セリンの分解酵素阻害剤等を投与することによって、生体中のD型セリンを増加させるような、統合失調症の治療方法を意味する。

20 D型セリン療法が有効な統合失調症患者を選別する指標としては、上述の統合失調症の指標を用いることが出来る。

即ち、D型セリン療法が有効な統合失調症患者を選別する指標としては、例えば、

I ) 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より低いこと。

II ) 生体試料中のL型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より

25 高いこと。

III ) 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値より低いこと。

等の指標が挙げられる。

さらに、D型セリン療法が有効な統合失調症患者を選別する好ましい指標としては、例えば、

- IV) 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値－標準偏差より低いこと。
- 5 V) 生体試料中のD型セリン濃度が統合失調症個体又は個体群における該濃度の平均値＋標準偏差より低いこと。
- VI) 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値－標準偏差より低いこと。
- VII) 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が統合失調症個
- 10 体又は個体群における該割合の平均値＋標準偏差より低いこと。

等が挙げられる。

また、以上のことから、アミノ酸標識試薬、好ましくはアミノ酸蛍光標識試薬、より好ましくは4-フルオロー-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾールは統合失調症の検査、診断用試薬として用いることが出来る。

15 本発明方法は、また「抗統合失調症薬の候補物質」の判定にも有用である。すなわち、D型セリンを増加させる作用あるいはL型セリンを減少させる作用を有する化合物は、抗統合失調症薬として有用である可能性がある。「抗統合失調症薬の候補物質」は、試験者が所望する任意の物質であり得る。

#### 実施例

20 以下、試験例により、本発明をさらに詳細に説明するが、いかなる意味においても本発明の範囲を限定するものではない。

##### 試験例 1

健常者 42名及び統合失調症患者 42名より血液を採取した後、通常の方法で血清を分離し、以下の試験に供した。すべての患者はDSM-IVに従って診断され、専門医によるBPRSスコア判定が行われた。被験者の背景は表1に示した通りである。

##### (試験方法)

ヒト血清 20  $\mu$ Lにメタノール 180  $\mu$ Lを加えて、除タンパク後、遠心し、この上清 20  $\mu$ Lに 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を 20  $\mu$ L、50 mM NBD

—Fのアセトニトリル溶液を60 $\mu$ L加えた後、60°Cで1分間加温した。これに0.1%トリフルオロ酢酸含有の水／アセトニトリル混液(90/10)200 $\mu$ Lを加えた。この溶液10 $\mu$ LをHPLCに注入した。

HPLCとしては、ODSカラム(TSKgel ODS-80Ts(東ソー社製))とキラルカラム(Sumichiral OA-2500(S)(住化分析センター社製))を6方バルブで接続したカラムスイッチングHPLCを使用した。これにより、ODSカラムにてNBD標識セリン(NBD標識D型セリンとNBD標識L型セリンの和)を分離・定量し、続いてキラルカラムでNBD標識D型セリンとNBD標識L型セリンを分離・定量した。NBD標識セリンの検出・定量には蛍光検出器(日立社製)を用いた。励起波長は470nm、蛍光波長は530nmである。

ODSカラムによるNBD標識セリンの分離・定量に際しては、移動相は0.8mL/minの定流速で流した。移動相としてはA液(0.1%トリフルオロ酢酸含有の水／アセトニトリル混液(90/10))、B液(0.1%トリフルオロ酢酸含有の水／アセトニトリル混液(10/90))およびC液(アセトニトリル)を用意した。

溶出条件は以下の通りである。

0～25.0分 A液：B液：C液=92:8:0

25.1～35.0分 A液：B液：C液=0:100:0

35.1～45.0分 A液：B液：C液=0:0:100

キラルカラムによるNBD標識D型セリンとNBD標識L型セリンの分離・定量に際しては、移動相は0.8mL/minの定流速で流した。移動相としては、15mMクエン酸のメタノール溶液を用いた。

NBD標識D型セリンとNBD標識L型セリンの定量に際しては、D型セリンおよびL型セリンの標準品(シグマ社製)を上記と同様に処理し、検量線を作製した。各試料を処理した際に得られる蛍光ピーク面積を検量線にプロットし、D型セリン濃度およびL型セリン濃度を算出した。

以上の操作により、ヒト血清中のD型セリンならびにL型セリンを定量した。

(結果)

健常者群と統合失調症群において、ヒト血清中のD型セリン及びL型セリンの含量

を高速液体クロマトグラフィーにて測定し、濃度を算出した。その結果を表1に示す。

表1

	健常者群 n=42, M/F=21/21 mean±S. D.	統合失調症群 n=42, M/F=22/20 mean±S. D.	P value
年齢	35.5±14.4 (20-70)	36.0±14.7 (16-75)	0.932
発病年		25.3±11.6 (13-57)	
罹患期間 (年)		10.2±11.0 (0-41)	
BPRS スコア			
Total		23.1±14.5 (2-58)	
Positive		13.3±9.85 (2-37)	
Negative		5.12±4.02 (0-16)	
Total Serine (μmol/L)	177.3±30.7	199.7±46.6	0.017
D-Serine (μmol/L)	2.28±0.59	1.86±0.53	0.001
L-Serine (μmol/L)	175.0±30.6	197.9±46.4	0.013
Ratio (%)			
D-Serine/Total Serine	1.34±0.34	0.95±0.26	<0.0001

統合失調症群では、D型セリンのレベルは、平均1.86 μmol/L、健常者では、D型セリンのレベルは、平均2.28 μmol/Lであった。この2群間の値をノンパラメトリック・マンホイットニ・Uテストで解析した結果、統合失調症患者で有意 ( $z = -4.78$ ,  $p = 0.001$ ) に減少していることが判った。また、未治療の患者と治療中の患者においてD型セリン濃度の有意な変化は認められなかった。さらに、治療中の患者においてもクロルプロマジン換算で統計解析した結果、D型セリン濃度と10相関していないこと、さらに罹病期間とも相関していないことが判った。統合失調症

群では、L型セリンのレベルは、平均197.9  $\mu\text{m}\text{o}\text{l}/\text{L}$ 、健常者では、L型セリンのレベルは、平均175.0  $\mu\text{m}\text{o}\text{l}/\text{L}$ であった。この2群間の値をノンパラメトリック・マンホイットニ・Uテストで解析した結果、統合失調症患者で有意 ( $z = -2.49$ ,  $p = 0.013$ ) に増加していることが判った。統合失調症群では、全セリンに対するD型セリンの割合は、平均0.95%、健常者では、全セリンに対するD型セリンの割合は、平均1.34%であった。この2群間の値をノンパラメトリック・マンホイットニ・Uテストで解析した結果、統合失調症患者で有意 ( $z = -4.78$ ,  $p < 0.0001$ ) に減少していることが判った。

#### 産業上の利用可能性

10 本発明の方法を用いれば、血清中のD型セリン、L型セリンの濃度を指標とすることにより、被験者が統合失調症に罹患しているか否かを客観的に検査、診断することができる。

本出願は、日本で出願された特願2002-195315を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

1. 生体試料中の (a) D型セリン、(b) L型セリン又は (c) D型セリン及びL型セリンの濃度を測定することを特徴とする統合失調症の検査方法。
2. 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より低いことを指標とする請求の範囲 1 記載の統合失調症の検査方法。
3. 生体試料中のD型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値－標準偏差より低いことを指標とする請求の範囲 1 記載の統合失調症の検査方法。
4. 生体試料中のD型セリン濃度が統合失調症個体又は個体群における該濃度の平均値+標準偏差より低いことを指標とする請求の範囲 1 記載の統合失調症の検査方法。
5. 生体試料中のL型セリン濃度が健常個体又は個体群における該濃度の平均値より高いことを指標とする請求の範囲 1 記載の統合失調症の検査方法。
6. 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合を指標とする請求の範囲 1 記載の統合失調症の検査方法。
7. 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値より低いことを指標とする請求の範囲 6 記載の統合失調症の検査方法。
8. 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が健常個体又は個体群における該割合の平均値－標準偏差より低いことを指標とする請求の範囲 6 記載の統合失調症の検査方法。
9. 生体試料中のトータルセリン濃度に対するD型セリン濃度の割合が統合失調症個体又は個体群における該割合の平均値+標準偏差より低いことを指標とする請求の範囲 6 記載の統合失調症の検査方法。
10. D型セリン療法が有効な統合失調症患者を選別する請求の範囲 1 乃至 9 のいずれかに記載の統合失調症の検査方法。
11. アミノ酸標識試薬を用いる請求の範囲 1 乃至 10 のいずれかに記載の統合失調症の検査方法。
12. 生体試料にアミノ酸標識試薬を接触させ、セリンを標識する工程及び標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程を含む請求の範囲 11 記載の統合失調症の検査方法。

失調症の検査方法。

13. 標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程の前に標識セリンを分離・定量する工程を更に含む請求の範囲12記載の統合失調症の検査方法。

14. 標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程にカラム又はキャピラリーを用いる請求の範囲12記載の統合失調症の検査方法。

15. 標識D型セリンと標識L型セリンとを分離・定量する工程にカラム又はキャピラリーを用いる請求の範囲13記載の統合失調症の検査方法。

16. 標識セリンを分離・定量する工程にクロマトグラフィーを用いる請求の範囲13記載の統合失調症の検査方法。

17. 標識セリンを分離・定量する工程にクロマトグラフィーを用いる請求の範囲15記載の統合失調症の検査方法。

18. カラム又はキャピラリーが光学分割用カラム又はキャピラリーである請求の範囲14、15又は17記載の統合失調症の検査方法。

19. クロマトグラフィーが高速液体クロマトグラフィーである請求の範囲16又は17記載の統合失調症の検査方法。

20. クロマトグラフィーが高速液体クロマトグラフィーであり、カラム又はキャピラリーが光学分割用カラム又はキャピラリーである請求の範囲17記載の統合失調症の検査方法。

21. アミノ酸標識試薬がアミノ酸蛍光標識試薬である請求の範囲11乃至20のいずれかに記載の統合失調症の検査方法。

22. アミノ酸蛍光標識試薬が4-フルオロ-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾールである請求の範囲21記載の統合失調症の検査方法。

23. アミノ酸標識試薬を含有する統合失調症の検査用試薬。

24. アミノ酸標識試薬がアミノ酸蛍光標識試薬である請求の範囲23記載の統合失調症の検査用試薬。

25. アミノ酸蛍光標識試薬が4-フルオロ-7-ニトロ-2, 1, 3-ベンズオキサジアゾールである請求の範囲24記載の統合失調症の検査用試薬。

26. 血清中のD型セリン及びL型セリンの濃度を測定し、濃度の増減を指標とす

ることを特徴とする統合失調症の検査、診断方法。

27. 血清中のD型セリン濃度を測定し、濃度の減少を指標とすることを特徴とする統合失調症の検査、診断方法。

28. 血清中のL型セリン濃度を測定し、濃度の増加を指標とすることを特徴とする統合失調症の検査、診断方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08525

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/68, G01N33/50, G01N30/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/48-98, G01N30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST (JOIS), CA (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	MAES et al., "Increased Plasma Serine Concentrations in Depression", <i>Neuropsychobiology</i> Vol.31, (1995), pages 10 to 15	23, 24/25/ 1-22
Y/A	YAO et al., "CSF serine levels in schizophrenia", <i>Journal of Neurochemistry</i> , Vol.78, suppl.1, (2001), page 158	23-25/1-22
Y	JP 61-80051 A (Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.), 23 April, 1986 (23.04.86), (Family: none)	23-25
P, X	HASHIMOTO et al., "Decreased Serum Levels of D-Serine in Patients With Schizophrenia", <i>ARCHIVES OF GENERAL PSYCHIATRY</i> , Vol.60, (June 2003), pages 572 to 576	1-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 August, 2003 (11.08.03)

Date of mailing of the international search report  
02 September, 2003 (02.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08525

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 26-28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 26 to 28 pertain to diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1. 7 G01N33/68, G01N33/50, G01N30/88

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1. 7 G01N33/48-98, G01N30/88

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)  
JICST(JOIS), CA(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	MAES et al, "Increased Plasma Serine Concentrations in Depression" Neuropsychobiology Vol. 31 (1995) p. 10-15	23, 24/25 /1-22
Y/A	YAO et al, "CSF serine levels in schizophrenia" Journal of Neurochemistry, Vol. 78, suppl. 1(2001) p158	23-25/ 1-22
Y	JP 61-80051 A (東洋曹達工業株式会社) 1986. 04. 23 (ファミリーなし)	23-25

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論  
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

11. 08. 03

## 国際調査報告の発送日

02.09.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



2 J 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
PX	HASHIMOTO et al, "Decreased Serum Levels of D-Serine in Patients With Schizophrenia" ARCHIVES OF GENERAL PSYCHIATRY, Vol. 60 (June 2003) p. 572-576	1-25

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 26-28 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 26-28 は診断方法であり、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。